

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE  
FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY



## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

### **Nanovláknenné materiály v inženýrství kostní tkáně**

Nanofibrous materials in bone tissue engineering

Martina Zajdlová

Školitel: MUDr. Lucie Bačáková, CSc.

Praha 2011

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci „Nanovláknenné materiály v inženýrství kostní tkáně“ vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 6. 5. 2011

.....

Podpis

## **Poděkování**

Chtěla bych velmi poděkovat především své školitelce MUDr. Lucii Bačákové, CSc., z Fyziologického ústavu Akademie věd ČR, za její odborné rady, zkušenosti a připomínky. Dále velmi děkuji Mgr. Katarině Novotné za skvělou pomoc při kultivačních a biochemických experimentech a za její pomoc při interpretaci výsledků experimentu. Mé poděkování patří také firmě Elmarco s.r.o., Liberec, a to zejména její pracovníci Ing. Marcele Munzarové, za přípravu nanovláknenných materiálů. V neposlední řadě děkuji doc. RNDr. Martinu Kalousovi, CSc., z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze za konzultace ohledně potřebných oficiálních formalit.

## Abstrakt

Tato práce je zaměřena na nanovláknenné materiály, které nacházejí perspektivní uplatnění v nové moderní mezioborové disciplíně – tkáňovém inženýrství. V minulosti se vyvíjely různé strategie při tvorbě materiálů určených k tkáňovému inženýrství, od materiálů nedovolujících adhezi žádných buněk na svůj povrch. tzv. bioinertních až po současnou snahu vytvořit tzv. „hybridní bioarteficiální orgány“. Především v inženýrství kostní tkáně mají velký potenciál polymerní materiály v podobě nanovláknenné sítě, jako například poly(laktid) nebo poly(kaprolakton) s anorganickou příměsí, např. ve formě nanokrystalického hydroxyapatitu. Materiál v takovéto podobě napodobuje přirozenou strukturu kostní tkáně a tím stimuluje adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk do žádaného buněčného typu. V experimentální části této práce byl jeden z těchto nadějných nanomateriálů otestován na jeho biokompatibilitu v podmínkách *in vitro*. Poly(laktid) v podobě nanovláknenné sítě s 0, 5 a 15 hmotnostními % nanokrystalického hydroxyapatitu byl připravený firmou Elmarco s.r.o., Liberec. Buňky lidských osteoblastů linie MG 63 byly na těchto materiálech kultivovány po dobu 1, 3 a 7 dní. Výsledky poukazují na výhodu příměsi hydroxyapatitu, který stimuluje buňky k tzv. osteogenní diferenciaci a zároveň umožňuje i relativně dobrou adhezi a proliferaci buněk. Poly(laktid) s 5 nebo 15 % hydroxyapatitu se tak dá považovat za nadějný materiál pro inženýrství kostní tkáně.

**Klíčová slova:** tkáňové inženýrství, lidské osteoblasty linie MG 63, poly(laktid), nanokrystalický hydroxyapatit, integrinové receptory

## Summary

This thesis focuses on nanofibrous materials which are highly promising regarding their application in a modern interdisciplinary scientific field – tissue engineering. Through the years there have been developed various strategies for creating materials usable in tissue engineering. The earliest materials that were made did not allow any cell adhesion on their surfaces (so-called “bioinert” materials), whereas nowadays there is an effort to create hybrid bioartificial organs. Especially in bone tissue engineering do polymeric materials in the form of a nanofibrous network, such as polylactide or polycaprolactone with the addition of inorganic particles (for example nanocrystalline hydroxyapatite), show great potential. Such materials mimic the natural bone tissue and stimulate the adhesion, proliferation and differentiation of cells into desirable cell type. In the experimental part of this thesis one of these promising nanomaterials was tested for its biocompatibility *in vitro*. Polylactide in the form of nanofibrous networks with 0, 5 and 15 % of nanocrystalline hydroxyapatite was provided by Elmarco s.r.o, Liberec. Human osteoblast-like cells MG 63 were cultivated on these materials for 1, 3 and 7 days. The results show the convenience of hydroxyapatite particles which stimulate the cells to the so-called osteogenic differentiation, and at the same time allow relatively good adhesion and cell proliferation. Polylactide with 5 or 15 % of hydroxyapatite can be considered to be a promising material for bone tissue engineering.

**Key words:** tissue engineering, human osteoblast-like cells MG 63, poly(lactid), nanocrystalline hydroxyapatite, integrin receptors

## Obsah

<b>1.</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Historie nanomateriálů .....</b>	<b>2</b>
<b>3.</b>	<b>Využití nanomateriálů .....</b>	<b>2</b>
3.1.	<i>Tkáňové inženýrství .....</i>	<i>3</i>
<b>4.</b>	<b>Materiály pro tkáňové inženýrství.....</b>	<b>3</b>
4.1.	<i>Bioinertní materiály.....</i>	<i>4</i>
4.2.	<i>Tvorba bioinertního materiálu .....</i>	<i>4</i>
4.3.	<i>„Bioaktivní“ materiály .....</i>	<i>5</i>
4.4.	<i>Tvorba „bioaktivního“ materiálu.....</i>	<i>5</i>
4.4.1	Povrchová drsnost.....	5
4.4.2	Porozita .....	7
4.5.	<i>„Biomateriály třetí generace“ .....</i>	<i>9</i>
<b>5.</b>	<b>Molekulární mechanismy interakce kostní buňka-materiál .....</b>	<b>12</b>
5.1.	<i>Integriny – hlavní receptory buněčné adheze .....</i>	<i>13</i>
<b>6.</b>	<b>Konkrétní druhy materiálů v inženýrství kostní tkáně .....</b>	<b>15</b>
<b>7.</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>17</b>
7.1.	<i>Materiály a metody.....</i>	<i>17</i>
7.1.1	Příprava materiálů na kultivaci buněk.....	17
7.1.2	Kultivace buněk .....	18
7.1.3	Hodnocení morfologie buněk .....	18
7.1.4	Hodnocení adheze a růstu buněk.....	18
7.1.5	Hodnocení diferenciací buněk.....	19
7.1.6	Statistická analýza .....	20
7.2.	<i>Výsledky.....</i>	<i>20</i>
7.2.1	Adheze a růst buněk na materiálech .....	20
7.2.2	Morfologie buněk .....	21
7.2.3	Osteogenní diferenciací buněk .....	23
7.3.	<i>Diskuze .....</i>	<i>24</i>
<b>8.</b>	<b>Závěr a další perspektivy .....</b>	<b>26</b>
<b>9.</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>27</b>

## 1. Úvod

První materiály, určené k použití uvnitř lidského těla, byly vyvinuty během šedesátých a sedmdesátých let 20. století. Během osmdesátých let již bylo v klinické praxi více než 50 různých typů implantátů. Jednalo se především o ortopedické a dentální protézy, převážně z kovových nebo keramických materiálů. Postupem času se ale ukázalo, že třetina až polovina všech protéz selže do 10 až 25 let a je potřeba revizní operace. Ani dvacet let výzkumu nemělo však žádný významný vliv na zlepšení tohoto selhávání (Hench & Polak, 2002). Živý organismus dokáže reagovat na měnící se fyziologické hodnoty a biochemické stimuly, syntetický materiál ovšem ne. Řešením tohoto problému tak mohou být materiály podporující léčebný proces již na buněčné úrovni. Propojením specifické stimulace buněčných procesů a postupné degradace materiálu by se tak mohlo docílit kompletní regenerace poškozené tkáně.

V současnosti jsou jedním z těchto nadějných materiálů nanovláknenné materiály, na které je zaměřena tato práce. Je blíže zaměřena na vývoj výše zmíněných strategií, který vedl až ke vzniku samostatného oboru, zabývajícího se náhradami poškozených tkání – tkáňovému inženýrství. Práce dále blíže pojednává o interakcích mezi materiálem a buňkami, jejichž pochopení je zásadní pro návrh vhodného materiálu. V krátké experimentální části jsme testovali biokompatibilitu poly(laktidu) ve formě nanovláknenné sítě s anorganickou příměsí hydroxyapatitu, který se jeví jako vhodný a v budoucnu využitelný materiál pro regeneraci kostní tkáně.

## **2. Historie nanomateriálů**

O nanomateriálech se začalo mluvit zhruba v 50. letech 20. století. Možné budoucí využití nanotechnologií nastínil jeden z udávaných zakladatelů oboru Richard Feynman, a to ve své slavné přednášce v roce 1958 – „There’s Plenty of Room at the Bottom“. V té době ještě nebylo zmíněno přímo slovo „nanotechnologie“, které pochází z řeckého slova *nanos* (trpaslík) a *technés* (dovednost). Nanotechnologie je technický obor, zabývající se tvorbou a použitím materiálů v měřítku nano, tj.  $10^{-9}$ , a právě o nastupující éře tohoto oboru pojednává americký fyzik Kim Eric Drexler ve své knize „Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology“ z roku 1986. S nástupem 90. let začal rozvoj mikrosystémového a genetického inženýrství a první úspěšné pokusy v oblasti technologií v měřítku nanometrů. V současné době přispěla významným dílem k rozvoji výroby nanovláknenných materiálů také Technická universita v Liberci a firma Elmarco s.r.o. Tito partneři ve spolupráci vyvinuli techniku tzv. elektrostatického zvlákňování a přístroj Nanospider, který se k tomuto účelu využívá.

## **3. Využití nanomateriálů**

Nanomateriály nacházejí uplatnění v mnoha různých oborech. V medicíně například v cílené dodávce léčiv, při výrobě ochranných roušek a desinfekčních roztoků nové generace, a v neposlední radě v tkáňovém inženýrství. V praxi jsou běžně používány samovstřebatelné stehy z různých polymerních materiálů. V elektronice se nanomateriály uplatňují například při výrobě paměťových médií nebo bioelektroniky. V chemickém průmyslu se využívají nanotrubičky a nanokompozity. Ve strojírenství se uplatňují supertvrdé povrchy s nízkým třením. Využití nacházejí i v textilním průmyslu pro výrobu nemačkových hydrofobních nešpinících se materiálů.



### **3.1. Tkáňové inženýrství**

Samostatnou zmínku v této kapitole zasluhuje nová, perspektivní a mezioborová vědní disciplína tkáňové inženýrství. Tento obor směřuje k tvorbě materiálů, které by mohly být využity jako funkční náhrady pro některé nevratně poškozené tkáně, případně pro celé orgány. Lékaři v případě poškození tkáně nebo celého orgánu řeší často tuto situaci pomocí transplantace orgánu z dárce do příjemce, či alespoň pomocí mechanických zařízení, jako je přístroj na dialýzu. Přestože tyto terapie ušetřují a zlepšují nespočet životů, zůstávají stále neúplné. Transplantace jsou vysoce limitovány kritickým nedostatkem dárců, které vedou případně až k situaci, kdy pacient umírá, zatímco je na čekací listině. Proto se snaží tkáňové inženýrství propojit principy biologie a inženýrství a vyvinout biologické náhrady, které by znovunahradily, podpořily nebo zlepšily funkci tkáně. Velký počet různých vědních oborů je rozhodující pro úspěch tkáňového inženýrství. Musí být pochopeno mnoho zákonitostí vycházejících z buněčné biologie, jako například faktory regulující buněčnou diferenciaci a růst, nebo vliv složek extracelulární matrix na buněčné funkce. Znalosti z imunologie a molekulární genetiky přispívají k návrhu vhodných modifikací buněk (například pomocí genové terapie), aby tyto buňky nebyly následně odmítnuty imunitním systémem (Langer & Vacanti, 1993). Hlavní pozornost studia se však soustřeďuje na materiály, využitelné v tkáňovém inženýrství, kterým je věnována následující kapitola.

## **4. Materiály pro tkáňové inženýrství**

Jak bylo nastíněno v kapitole č. 3, nacházejí nanomateriály velký budoucí potenciál v tkáňovém inženýrství. Hlavní požadavek na materiály je mimo jejich vhodných mechanických vlastností tzv. biokompatibilita. To znamená, že materiál by měl být přijat okolními tkáněmi, a v konečném důsledku i celým organismem, jako tělu vlastní. Jinými

slovy, materiál by neměl vyvolávat imunitní reakce, měl by být netoxický a nekarcinogenní (Park & Bronzino, 2003).

#### **4.1. Bioinertní materiály**

Při výrobě biokompatibilních materiálů se uplatňují dvě hlavní strategie, upravující interakci mezi buňkami a materiálem. První strategie je vyvinout inertní povrch, který by nedovoloval adsorpci proteinů a adhezi buněk, a tím zajistil ochranu před aktivací imunitního systému, srážením krve a dalšími interakcemi mezi materiálem a vnitřním prostředím (Hench & Polak, 2002). Jinými slovy by materiál měl být bioinertní. Někteří autoři je nazývají jako „materiály první generace“. Tento typ biomateriálu byl použit například pro konstrukci hlavice a jamky kloubní protézy (Cook *et al.*, 1997) nebo oční čočky (Han *et al.*, 2003; Smetana *et al.*, 1987).

#### **4.2. Tvorba bioinertního materiálu**

Povrchy, které zabraňují adhezi buněk, jsou vytvářeny použitím různých přírodních nebo syntetických molekul, jako je např. antiadhezivní protein albumin (Wang *et al.*, 2002a), hydrogely založené na kyselině hyaluronové (Park *et al.*, 2003) nebo velmi často využívaný poly(ethylen glykol) (PEG) (Banerjee *et al.*, 2000; VandeVondele *et al.*, 2003) a poly(ethylenoxid) (PEO) (Irvine *et al.*, 2001; Kim & Kim, 2002; Wang *et al.*, 2002a); dále pak poly(hydroxyethyl methakrylát) (Smetana & Vacík, 1997; Han *et al.*, 2003), polyvinyl alkohol, polyakrylamid nebo dextran (VandeVondele *et al.*, 2003). Kvůli své nízké mechanické odolnosti jsou často (obzvláště PEG a PEO) používány ve formě postranní skupin připojených k základní kostře, tvořené například latexem (Banerjee *et al.*, 2000), poly(methylmethakrylátem) (Irvine *et al.*, 2001), polyurethanem (Wang *et al.*, 2002a), poly(L-lysinem) (VandeVondele *et al.*, 2003) a hlavně polylaktidem (Kubies *et al.*, 2000; Rypáček *et al.*, 2001). Postranní řetězce PEO nebo PEG brání adsorpci proteinů a následné buněčné

adhezi zprostředkované vazbou receptorů k těmto proteinům. Děje se tak v důsledku vysoké hydrofilie i pohyblivosti těchto řetězců (Kim & Kim, 2002; Wang *et al.*, 2002a). Nadějnou strategií je možnost funkcionalizovat konce postranních řetězců PEO nebo PEG ligandy pro adhezní receptory buněk, např. integriny.

### **4.3. „Bioaktivní“ materiály**

Další strategie směřuje k vytvoření materiálů, některými autory označovaných jako „biomateriály druhé generace“. U nich je naopak snaha o „bioaktivitu“ materiálu, který by podporoval migraci, proliferaci, diferenciaci, dlouhou životnost a dobrou funkčnost buněk, vedoucí ke kvalitní integraci implantátu do okolní tkáně. Interakce buněk s materiálem by měla být kontrolovatelná fyzikálními a chemickými vlastnostmi povrchu materiálu (Hench & Polak, 2002), které budou rozebrány dále.

### **4.4. Tvorba „bioaktivního“ materiálu**

Adsorpce proteinů a adheze buněk k materiálu je značně ovlivněna fyzikálními a chemickými vlastnostmi povrchové vrstvy materiálu jako je povrchová drsnost, porozita, rozpustnost, smáčivost, elektrický náboj, mechanická pevnost, krystaličnost, pH nebo výskyt různých funkčních skupin, např. aminové skupiny nebo kyslíku (Cook *et al.*, 1997; Smetana & Vacík, 1997; Bačáková *et al.*, 2000; Bačáková *et al.*, 2001a; Bačáková *et al.*, 2001b). V následujících podkapitolách bude blíže zmíněna povrchová drsnost a porozita materiálů.

#### **4.4.1 Povrchová drsnost**

Podle velikosti nepravidelností povrchu materiálu rozlišujeme makrodrsnost (100  $\mu\text{m}$  - milimetry), mikrodrsnost (100 nm – 100  $\mu\text{m}$ ) a nanodrsnost (méně než 100 nm).

Makrodrsnost lze považovat za výhodnou povrchovou vlastnost materiálu, protože zlepšuje zakotvení implantátu v přirozené tkáni a přitom nijak neomezuje buňky v jejich adhesi a rozprostření.

Mikrodrsnost je na jednu stranu považována za negativní, a to v tom smyslu, že buňky mohou být limitovány topografií povrchu při své adhezi. Jinými slovy, adherující buňky, jejichž rozměry jsou obvykle v desítkách mikrometrů, jsou na mikrostrukturovaných površích často nuceny se vyhýbat nerovnostem, tj. adherovat mezi nimi či je přemostovat, což snižuje plochu kontaktu buňka-materiál. Například kompozity uhlík-uhlík, tj. materiály s uhlíkovou matricí vyztuženou uhlíkovými vlákny, svého času považované za perspektivní pro konstrukci kostních implantátů, měly na svém povrchu nerovnosti v řádu mikrometrů, způsobené vyvýšením uhlíkových vláken nad matrici. Kostní buňky v kulturách na těchto kompozitech pak adherovaly a rostly přednostně v brázdách mezi vyvýšeninami, kde zaujímaly vřetenovitý tvar a měly poměrně málo vyvinuté fokální adhesní plaky (tj. domény na buněčné membráně obsahující adhesní receptory a s nimi asociované molekuly). Pokud však byly vyvýšeniny na materiálu alespoň částečně vyrovnány leštěním povrchu koloidním oxidem křemičitým nebo diamantovou pastou, buňky byly schopny adherovat ve výrazně vyšším počtu a větší adhesní plochou, zaujímaly polygonální tvar a měly dobře vyvinuté fokální adhesní plaky. Rovněž následný růst těchto buněk byl rychlejší a koncentrace markerů osteogenní diferenciaci (tj. osteokalcinu, osteopontinu) v buňkách statisticky významně vyšší (Bačáková *et al.*, 2001a; Starý *et al.*, 2003).

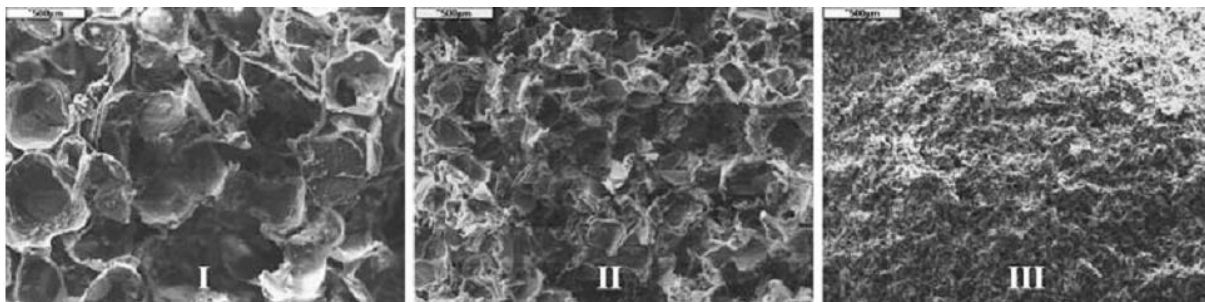
Na druhou stranu někteří autoři udávají zvýšenou tendenci osteoblastů k diferenciaci při růstu na mikrodrsném povrchu. Opírají se přitom o nálezy exprese genů navozujících osteogenní diferenciaci těchto buněk i vyšší stupeň mineralizace extracelulární matrix v porovnání s buňkami rostoucími na hladkém povrchu (Schneider *et al.*, 2003; Lossdorfer *et al.*, 2004). Uvedené disproporce ve výsledcích jednotlivých autorských týmů je možno vysvětlit faktem, že chování buněk na mikrodrsných površích je určováno nejen velikostí nerovností, ale především jejich tvarem a vzdáleností. Nepravidelnosti povrchu mají různé tvary, například pyramidovitý, drážkovitý nebo se zakulacenými póry. Obecně lze říci, že úzké, ostré a špičaté nerovnosti, hustě rozložené po povrchu materiálu, narušují proces adheze buněk výrazněji než nerovnosti oblé s poměrně dlouhými vzdálenostmi mezi sebou. Proto je obtížné porovnávat výsledky studií od různých výzkumných týmů, neboť tyto studie

bývají obvykle založeny pouze na velikosti nerovností, popisované parametrem  $R_a$  (aritmetická střední hodnota drsnosti).

Naproti tomu nepravidelnosti v rozměrech nanometrů se ukázaly jako jednoznačně pozitivní a podporující adhezi, proliferaci a expresi diferenciačních markerů buněk, zejména kostních. Přesný mechanismus efektu nanodrsnosti není zcela objasněn. Někteří autoři udávají zvýšení adsorpce proteinů, selektivní adsorpci určitých typů proteinových molekul (např. vitronektin, který je přednostně rozpoznávám osteoblasty) a také zvýhodnění prostorové konformace proteinů, adsorbovaných na povrch materiálu, pro jejich dosažitelnost adhesními receptory buněk (Webster *et al.*, 2000; Woo *et al.*, 2003). Preferování nerovností v rozměrech nanometrů není překvapující, když si uvědomíme, že v přirozené kostní tkáni jsou složky extracelulární matrix také organizované v rozměrech nanometrů. Proto se mnoho nově tvořených biomateriálů snaží napodobit tuto strukturu extracelulární matrix konstrukcí povrchu s rozměry nanometrů. Jeden z těchto materiálů je polylaktid v podobě nanovláknenné sítě s anorganickou příměsí – nanokrystalickým hydroxyapatitem, který byl otestován v kulturách kostních buněk v laboratoři na FgÚ AV ČR, kde byla provedena tato studie, a pojednává o něm praktická část této práce.

#### **4.4.2 Porozita**

Ukázalo se, že u tzv. trojrozměrných materiálů, tj. porézních nosičů buněk určených k prorůstání buněk i do nitra materiálu, má na kolonizaci materiálu buňkami rozhodující vliv i velikost pórů v materiálu. Jako příklad lze uvést pokus provedený autory Pamula *et al.* (2008) s degradovatelným kopolymerem L-laktidu a glykolidu (PLG). Byly vyrobeny 3 typy PLG se stejnou porozitou (87%), ale s rozdílnými rozměry pórů – 600, 200 a 40  $\mu\text{m}$  (*Obr. 1*).



**Obr. 1:** Mikrofotografie kopolymeru L-laktidu a glykolidu s definovanými rozměry pórů: I (600  $\mu\text{m}$ ), II (200  $\mu\text{m}$ ), III (40  $\mu\text{m}$ ). Skenovací elektronový mikroskop, zvětšení 50 x. Převzato z: (Pamula *et al.*, 2008).

Na tyto materiály byly nasazeny lidské osteoblasty linie MG 63 a výsledky byly vyhodnocovány 5. a 7. den kultivace. Největší počty buněk byly zaznamenány na materiálu s největšími póry (600  $\mu\text{m}$ ), nejméně buněk bylo naopak na materiálu s nejmenší velikostí pórů (40  $\mu\text{m}$ ). Buňky na materiálech s největšími a středními póry prorůstaly do vnitřních prostorů materiálu, naopak buňky na materiálu s nejmenšími póry rostly pouze po povrchu. Materiál s póry velikosti 40  $\mu\text{m}$  tedy nedovoloval významné vrůstání buněk do vnitřku materiálu. To mohlo být způsobeno přednostní adhesí buněk v okolí pórů, „přemostováním“ pórů buňkami, a tím tvorbou souvislé vrstvy buněk na povrchu materiálu, která nedovolovala migraci buněk do vnitřních struktur materiálu. Materiál s póry velikosti 200  $\mu\text{m}$  dovoľoval buňkám vrůstání dovnitř, počet buněk na tomto materiálu však byl výrazně nižší než na materiálu s největšími póry. Z tohoto experimentu vychází tedy PLG s póry velikosti 600  $\mu\text{m}$  jako nejvýhodnější materiál pro kolonizaci lidskými osteoblasty v budoucích kostních implantátech. Někteří autoři však uvádějí, že velikost pórů okolo 200  $\mu\text{m}$  je vhodná nebo dokonce přímo optimální (Ishaug-Riley *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2000). Některé práce zas uvádějí, že formování nově vytvořené tkáně uvnitř pórů je přímo úměrné zvětšování průměru pórů v materiálu (Kose *et al.*, 2003; Akay *et al.*, 2004).

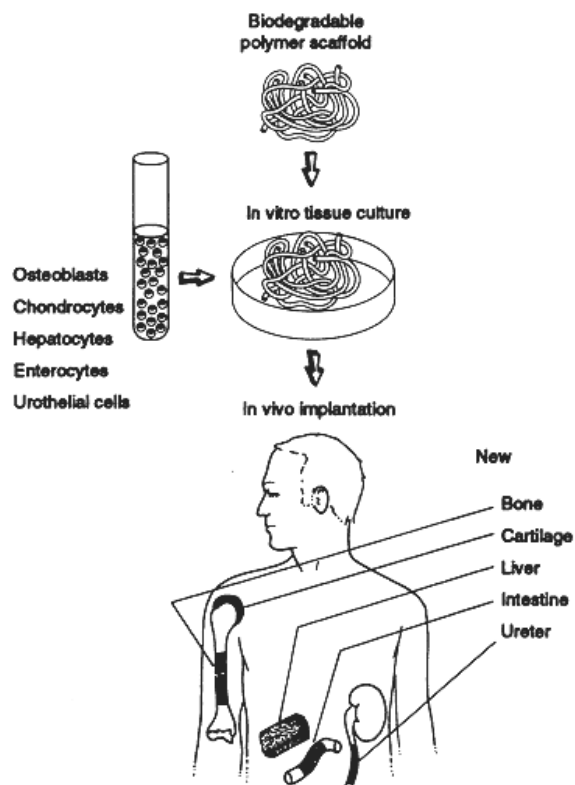
Tyto rozcházející se výsledky na optimální velikost pórů pro regeneraci kostní tkáně u různých autorů mohou být snad alespoň částečně vysvětleny rozdílným složením materiálů, rozdílným původem buněk a jejich typem a zvolenou metodou vyhodnocování tkáňové regenerace (například sledování počtu buněk, DNA syntézy, aktivity různých enzymů, produkci molekul extracelulární matrix). Jednotlivé práce se také liší v mnoha dalších

zvolených experimentálních podmínkách, jako je populační hustota buněk při nasazování, zvolení statické nebo dynamické kultivace, doba trvání kultivace, složení kultivačního média a podobně.

#### **4.5. „Biomateriály třetí generace“**

Nejvíce vyspělá strategie současného výzkumu v tkáňovém inženýrství je tvorba (již výše zmíněných) třídimenzionálních porézních konstrukcí, tvořících po kolonizaci buněčnými populacemi tzv. „hybridní bioarteficiální orgány“. Tyto konstrukce by měly být vstřebatelné a měly by umožnit kontrolované vrůstání a maturaci buněk. Mohly by být v podmínkách *in vitro* osazeny vlastními pacientovými buňkami, odebranými při biopsii a namnoženými v podmínkách buněčné kultury, nebo dokonce jeho kmenovými buňkami. V ideálním případě by měl být materiál po implantaci do těla postupně nahrazován nově vytvořenou extracelulární matrix a diferenciovanými buňkami, až by byl kompletně nahrazen regenerovanou a plně funkční tkání (Obr. 2). Z toho plyne, že tyto materiály by nefungovaly jako trvalé náhrady poškozených orgánů v těle, ale spíše jako dočasné struktury podporující regeneraci tkání.

Někteří autoři nazývají tyto materiály jako „biomateriály třetí generace“ a to proto, že stimulují specifickou buněčnou odpověď až na úrovni specifické exprese různých genů, regulujících procesy regenerace (Hench and Polak 2002).



**Obr. 2:** Předpoklad formování tkáňové struktury podobné přirozenému orgánu po nasazení buněk na vhodný materiál. Převzato z: (Langer & Vacanti, 1993).

Nedávné výzkumy ukázaly na genetickou kontrolu buněčné odpovědi osteoblastů při kontaktu s bioaktivními skly. Sedm skupin genů bylo aktivováno během 48 hodin po vystavení lidských osteoblastů iontovým produktům, vzniklých postupným rozkladem bioaktivních skel (*Tab. 1*). Up-regulované geny navozovaly syntézu specifických proteinů, které mají vliv na všechny aspekty diferenciacce a proliferace osteoblastů: (1) transkripční faktory a regulátory buněčného cyklu, (2) molekuly signální transdukce, (3) proteiny zapojené do syntézy DNA, její reparace a rekombinace, (4) růstové faktory a cytokiny, které ovlivňují zánětlivou odpověď na materiál, (5) povrchové antigeny a receptory, (6) komponenty extracelulární matrix a (7) apoptotické regulátory (Xynos *et al.*, 2001).



**Tab. 1:** Seznam více než dvojnásobně up-regulovaných genů u lidských osteoblastů po vystavení iontovým produktům, vzniklých rozpouštěním bioaktivních skel.

Převzato z: (Xynos *et al.*, 2001).

GeneBank Accession No.	Protein/Gene	Ratio	Function
M59040	CD44 antigen hematopoietic form precursor	7	Cell surface receptor
U12779	MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAP kinase 2)	6	Signal transduction
X06256	Integrin beta 1; fibronectin receptor beta subunit	6	Cell surface receptor
AF040105	RCL growth-related c-myc-responsive gene	5	Growth related gene
D15057	Defender against cell death 1 (DAD-1)	4.5	Apoptosis
Y00371	Heat shock cognate 71-kDa protein	4.5	Heat shock protein
X04106	Calpain; calcium-dependent protease small subunit	4.1	Apoptosis
X59798	G1/S-specific cyclin D1	4	Cell cycle regulator
D11428	Peripheral myelin protein 22	4	Cell surface antigen
M34079	26S protease regulatory subunit 6A; TAT-binding protein 1	4	Transcription factor
D26512	Matrix metalloproteinase 14 precursor (MMP14)	3.6	Matrix component
J03075	Protein kinase C substrate 80-kDa protein heavy chain	3.5	Signal transduction
U09579	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A)	3.4	Cell cycle regulator
L19185	Natural killer cell enhancing factor (NKEFB)	3.3	Antioxidant
M29645	Insulin-like growth factor II (IGF2)	3.2	Growth factor
L11285	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	3	Signal transduction
M13194	DNA excision repair protein ERCC1	3	DNA repair
U07418	MutL protein homolog	3	DNA repair
X69391	60S ribosomal protein L6	3	Transcription
M13667	Major prion protein precursor	3	Cell surface antigen
M37722	N-sam; fibroblast growth factor receptor1 precursor	3	Cell surface receptor
X79389	Glutathione S-transferase T1	3	Enzyme
L42379	Bone-derived growth factor 1 (BPGF1)	3	Growth factor
K00065	Cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1)	3	Enzyme
M26880	Ubiquitin	2.9	Enzyme
M17733	Thymosin beta 4; FX	2.9	Nuclear protein
J03210	Matrix metalloproteinase 2 (MMP2)	2.7	Matrix component
M37435	Macrophage-specific colony-stimulating factor (MCSF)	2.6	Growth factor
M92843	Tristetraproline	2.5	Transcription factor
D90209	cAMP-dependent transcription factor ATF-4	2.3	Transcription factor
X69550	rho GDP dissociation inhibitor 1	2.3	Signal transduction
M23619	High mobility group protein (HMG-I)	2.3	Nuclear protein
X15480	Glutathione S-transferase pi	2.3	Enzyme
X03124	Metalloproteinase inhibitor 1 precursor (TIMP1)	2.2	Matrix component
M14219	Decorin; bone proteoglycan II precursor	2.2	Matrix component
J05594	TIMP-2	2.1	Matrix component
M11233	Cathepsin D precursor	2	Enzyme
X60188	Extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1)	2	Signal transduction
M77234	fte-1	2	Transcription factor
AF060515	Cyclin K	2	Cell cycle regulator
M36340	ADP-ribosylation factor 1	2	Signal transduction
L35253	Mitogen-activated protein kinase p38 (MAP kinase p38)	2	Signal transduction
M36429	Guanine nucleotide-binding protein G-i/G-s/G-t beta subunit 2	2	Signal transduction
U32944	Cytoplasmic dynein light chain 1	2	Translocation
L07541	Replication factor C 38-kDa subunit	2	DNA synthesis
J00123	Proenkephalin A precursor	2	Cell surface receptor
M65212	Membrane-bound & soluble catechol-O-methyltransferase	2	Enzyme
U04847	Ini1	2	Transcription factor
L31881	Nuclear factor I (NFI)	2	Transcription factor
M30257	Vascular cell adhesion protein 1 precursor (V-CAM 1)	2	Cell adhesion
D28468	DNA-binding protein TAXREB302	2	Transcription factor
M62831	Transcription factor ETR101	2	Transcription factor
J03746	Microsomal glutathione S-transferase 12	2	Enzyme
X06985	Heme oxygenase 1 (HO1)	2	Enzyme
M35977	Vascular endothelial growth factor precursor (VEGF)	2	Growth factor
M36717	Ribonuclease/angiogenin inhibitor (RAI)	2	Nuclear protein
D16431	Hepatoma-derived growth factor (HDGF)	2	Growth factor
K03515	Neuroleukin (NLK)	2	Enzyme
M24545	Monocyte chemotactic protein 1 precursor (MCP1)	2	Cytokine
X04602	Interleukin-6 precursor (IL-6)	2	Cytokine

Buněčná a molekulární podstata při vývoji biomateriálů třetí generace dává vědecké opodstatnění pro zdokonalení molekulární struktury prostorových porézních nosičů buněk, tzv. „scaffoldů“ pro tkáňové inženýrství. Zároveň získávají tyto náhrady výhodu v podobě minimální invazivní operace. V budoucnu by mělo být uskutečnitelné, navrhnout materiál nové generace, aktivující specifické geny pro daného pacienta a onemocnění (Hench & Polak, 2002).

## **5. Molekulární mechanismy interakce kostní buňka-materiál**

Bezprostředně po implantování biomateriálu do organismu nebo po kontaktu s buněčnou kulturou se k jeho povrchu adsorbují proteiny. Adsorpce proteinů na povrch materiálu je velmi rychlý proces, probíhající během několika sekund (Horbett, 2004). Buňky se proto jen zřídka dostanou do přímého kontaktu s povrchem materiálu, neboť interagují s vrstvou adsorbovaných proteinů, které budou zmíněny dále a z nichž mnohé zprostředkují specifickou adhezi buněk řízenou receptory.

Přesto existuje takzvaná přímá, receptorem nezprostředkovaná vazba buněk k materiálu. Tato interakce mezi buňkami a materiálem je umožněna díky takzvaným slabým chemickým interakcím, jako jsou vodíkové vazby, elektrostatická vazba nebo iontová vazba mezi různými molekulami na buněčné membráně s funkčními skupinami na povrchu polymerního materiálu, tedy vazby bez přítomnosti proteinů extracelulární matrix nebo jejich funkčních částí (Bačáková *et al.*, 2000). Tato přímá interakce nezprostředkovaná receptorem však nemůže zajistit dostatečný přenos signálů z extracelulárního prostředí do buňky a přežití buněk závislých na ukotvení, tzv. „anchorage-dependent“ buněk. Pokud nejsou buňky schopné syntetizovat a deponovat svou vlastní extracelulární matrix v relativně krátkém čase (obvykle od 24 do 48 hodin po nasazení) nebo nemají některé z molekul extracelulární matrix přichyceny na své membráně, prodělají apoptózu (Huang *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 1999; Groth *et al.*, 1999).

Funkční vazba buněk k materiálu, tj. vazba, která zajistí přenos adekvátního signálu do buňky a její životaschopnost, je tedy zprostředkována vrstvou adsorbovaných proteinů na povrchu materiálu. Tyto proteiny pocházejí z okolního prostředí, tj. z média buněčné kultury

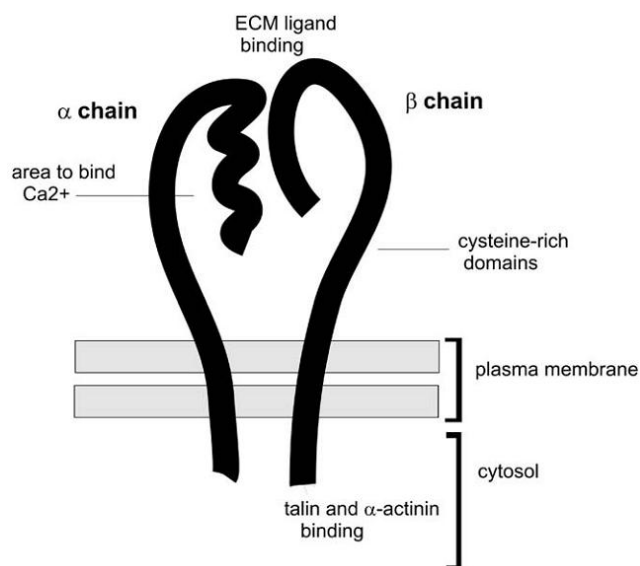
v případě *in vitro* experimentu nebo z fyziologických tekutin v případě *in vivo*. Mezi tyto molekuly patří například fibronektin, vitronektin, fibrinogen, imunoglobuliny, kolagen, laminin, albumin a další (Garcia *et al.*, 1999; Groth *et al.*, 1999; Keselowsky *et al.*, 2003). Tento typ interakce zprostředkuje funkční buněčnou adhezi a umožňuje přenos signálů do buňky pomocí buněčných receptorů. Proto je také některými autory označována jako receptorem zprostředkovaná interakce. Těmito receptory jsou nejčastěji integriny, kterým je věnována následující podkapitola. Je však známo, že i jiné, tj. neintegrinové receptory hrají roli v procesu adheze buněk. Například receptory na bázi proteoglykanů, které rozeznávají aminokyselinovou sekvenci lysin-arginin-serin-arginin (KRSR), specifickou pro osteoblasty, se mohou významným způsobem uplatnit při konstrukci kostních implantátů (Dee *et al.*, 1998).

### **5.1. Integriny – hlavní receptory buněčné adheze**

Integrinové receptory jsou doposud nejlépe prostudovaným typem buněčných adhezních receptorů. Jednotlivé integriny byly objevovány v průběhu 80. let a na konci tohoto desetiletí byly systematizovány do celku označeného názvem integriny. U živočichů jsou hlavními receptory pro buněčnou adhezi k proteinům extracelulární matrix, a u obratlovců mají navíc důležitý význam při mezibuněčné adhezi. Integriny byly nalezeny výhradně u živočichů, nebyly zaznamenány žádné homologы u prokaryot, rostlin nebo hub (Whittaker & Hynes, 2002).

Integriny jsou tvořeny heterodimerními transmembránovými glykoproteiny, skládající se z nekovalentně vázaných podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$  (Obr. 3). Délka řetězce  $\alpha$  je 1008-1152 aminokyselin, s cytoplazmatickou oblastí o 22-32 aminokyselinách a transmembránovou oblastí o 20-29 aminokyselinách. Délka řetězce  $\beta$  je okolo 770 aminokyselin, s cytoplazmatickou oblastí o 20-50 aminokyselinách a transmembránovou oblastí o 26-29 aminokyselinách. Bylo popsáno více různých typů řetězců  $\alpha$  i  $\beta$ . Extracelulární části podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$  spolu navzájem interagují a vytvářejí funkční heterodimer. Obě podjednotky obsahují disulfidické můstky, které je chrání před proteolýzou (Albelda & Buck, 1990).

Pro integriny je typické, že rozpoznávají relativně krátké peptidové motivy. Nejběžnějším vazebným motivem je tripeptid arginin-glycin-kyselina asparagová (RGD), což je hlavní motiv u řady proteinů extracelulární matrix, jako jsou fibronektin, vitronektin (Garcia, 2005), kolagen typu I, kostní sialoprotein, thrombospondin a osteopontin (Clover *et al.*, 1992). S RGD vazebným motivem kooperuje synergistická aminokyselinová sekvence, například prolin-histidin-serin-arginin-asparagin (PHSRN), která pomáhá udržovat vhodnou prostorovou konformaci jak vazebných ligandů, tak integrinového receptoru (Humphries *et al.*, 2000). Různé kombinace různých alfa a beta řetězců dávají vzniknout receptorům s preferenční afinitou k různým molekulám extracelulární matrix. Například  $\alpha_v\beta_3$  integrin rozpoznává sekvenci RGD na vitronektinu,  $\alpha_5\beta_1$  integrin je také receptorem pro RGD sekvenci, ale na fibronektinu. Na druhou stranu může jeden typ integrinu vázat více ligandů, například tento stejný integrin  $\alpha_5\beta_1$  váže mimo RGD sekvence také například RRETAWA (Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala) sekvenci (Bačáková *et al.*, 2004). Obecně tedy nejsou integrinové receptory striktně specifické pro určité ligandy, pouze jejich afinita může být pro některý ligand větší. Pokud se ale v prostředí zrovna nevyskytuje tento preferovaný ligand, mohou vázat i jiné typy molekul extracelulární matrix. Z tohoto důvodu jsou některými autory označovány jako „nejpromiskuitnější receptory“ (Horton, 1997; Hemler, 1998).



**Obr. 3:** Schematické znázornění struktury podjednotek integrinového receptoru.

Převzato z: (Siebers *et al.*, 2005).

Po navázání ligandu na receptor se integriny rychle propojí s aktinovým cytoskeletem a seskupí se na různých místech buněčné membrány do větších celků. Vytvoří tak supramolekulární komplexy nazývané fokální adhezivní plaky nebo jednoduše fokální adheze. Součástí tohoto komplexu jsou kromě samotných integrinů ještě další molekuly interagující s integriny, často rozdělované na strukturální a signální proteiny. Mezi strukturální proteiny patří například talin, vinkulin,  $\alpha$ -aktinin, filamin nebo paxillin (Horton, 1997; Hemler, 1998; Hynes, 1999). Mezi signální molekuly patří například fokální adhezivní kináza (FAK), integrin-linked kináza (ILK), cytohesin-1 nebo proteinkináza aktivovaná mitogeny (mitogen-activated protein kinase, MAPK). Strukturální i signální molekuly se podílejí na rozhodování o chování buňky po kontaktu s materiálem. Mají zásadní vliv na nasměrování buňky k proliferaci, diferenciaci nebo apoptóze (Hemler, 1998; Hynes, 1999).

Nadějnou budoucí strategií je zabudovat syntetické oligopeptidové ligandy na povrch bioinertních materiálů. Ligandy pro integriny a jejich kooperující sekvence by se navázaly v definovaném množství, typech a ve vhodné prostorové distribuci na povrch jinak neadhezivního materiálu. Tím by se docílilo řízené adheze specifických buněk i regulace jejich dalšího chování, a předcházelo se rovněž zánětlivým odpovědím, neboť krátké aminokyselinové sekvence nejsou druhově specifické a tudíž imunogenní.

## **6. Konkrétní druhy materiálů v inženýrství kostní tkáně**

Kostní tkáň se skládá z organické a anorganické složky a zjednodušeně se dá říci, že jde o kompozit organických a anorganických složek, především kolagenu typu I a hydroxyapatitu (Wang, 2003). Mezibuněčná hmota kostní tkáně je vyplněna především kolagenovými vlákny (organická složka), poskytujícími pevnost a sloužící jako výztuž, a anorganickými krystalky hydroxyapatitu a jiných fosfátů vápníku. Tato přirozená struktura kostí byla inspirací pro vznik řady syntetických polymerů, napodobujících organickou složku kosti. Dále jsou připravovány anorganické krystalky, např. hydroxyapatit nebo trikalciumpfosfát, které napodobují anorganickou složku kosti. Mezi nejpoužívanější syntetické polymery používané v medicíně patří např. poly(etylentereftalát) (PET),

poly(tetrafluoroetylen), poly(laktid), poly(glykolid), poly(kaprolakton), polyetylen nebo silikony (Griffith, 2000). Slibné polymery, které by se hodily právě, jako náhrada organické složky kosti jsou např. poly(laktidy) a jejich kopolymery s glykolidy (Kim *et al.*, 2006; Pamula *et al.*, 2008), polyamidy (Wang *et al.*, 2007) nebo materiály na bázi siloxanu (Ren *et al.*, 2002). Tyto zmíněné materiály jsou často kombinovány s anorganickými částicemi, které především zvýší mechanickou pevnost polymerů, ale také podstatně zvýší jejich biokompatibilitu. Nejčastější anorganickou příměsí kompozitů je hydroxyapatit (HA). Jeho hlavními výhodami je jeho vysoká biokompatibilita a bioaktivita, dokáže také vytvářet přímé vazby s kostními buňkami a tím vylepšit formování kostní tkáně. U materiálů s obsahem hydroxyapatitu byl prokázán stimulační efekt na buněčnou proliferaci (Vagaská *et al.*, 2006). Nanočástice hydroxyapatitu také zvyšují mechanickou pevnost materiálu (Wang *et al.*, 2002b). Této vlastnosti se dá využít především u třídimenzionálních porézních nosičů (tzv. „scaffoldů“), které mají relativně nízkou mechanickou pevnost. Aby materiál co nejvíce napodoboval přirozenou tkáň, je vyvíjeno úsilí vytvářet jeho polymerní složky i anorganické krystaly o rozměrech v řádu nanometrů.

## **7. Experimentální část**

V experimentální části této práce jsme testovali biokompatibilitu polylaktidu ve formě nanovláknenných sítí s příměsí nanokrystalického hydroxyapatitu nebo bez příměsí. Vyhodnocovali jsme růst a životaschopnost lidských osteoblastů MG 63 nasazených na tyto materiály.

Materiály byly připraveny v liberecké firmě Elmarco s.r.o. metodou elektrostatického zvlákňování (tzv. „electrospinning“).

Cílem práce bylo zhodnotit růst, adhezi a osteogenní diferenciaci buněk nasazených na polylaktid bez hydroxyapatitu a na polylaktid s 5% a 15% příměsí hydroxyapatitu a jejich možné budoucí využití v inženýrství kostní tkáně.

### **7.1. *Materiály a metody***

Byly testovány následující nanostrukturované materiály:

1. Polylaktid (PLA) s 0 hmotnostními % hydroxyapatitu (HA)
2. PLA s 5 hmotnostními % HA
3. PLA s 15 hmotnostními % HA

Jako kontrolní vzorek byly použity standardní polystyrenové kultivační misky (TCPS).

#### **7.1.1 Příprava materiálů na kultivaci buněk**

Materiály byly nastříhány na čtverce o rozměrech 2x2 cm a upevněny do plastových úchytů (Cell Crown, Scaffdex, Finsko, průměr 1,5 cm). Po dobu jedné hodiny byly vzorky sterilizovány v čistém 70% ethanolu a následující 2 dny promývány ve sterilní destilované a

neionizované vodě, a to za účelem vymytí zbytků etanolu či rozpouštědel použitých při zvláknování PLA. Den před nasazováním buněk byly umístěny do kultivačního média DMEM (Dulbecco-modified Eagle Minimum Essential Medium).

### **7.1.2 Kultivace buněk**

Materiály byly umístěny do kultivačních komůrek (TPP, Švýcarsko, destička s 12 komůrkami, průměr komůrky 2,1 cm) a byly osazeny lidskými osteoblasty linie MG 63 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) v počáteční hustotě cca 16 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Při nasazení každá komůrka obsahovala 50 000 buněk ve 2 ml kultivačního média DMEM (Dulbecco-modified Eagle Minimum Essential Medium) s 10% fetálním bovinním sérem a 40 µg/ml gentamycinu. Buňky byly kultivovány v termostatu v 37 °C a ve zvlhčované atmosféře vzduchu s 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 1, 3 a 7 dní.

### **7.1.3 Hodnocení morfologie buněk**

Vzorky byly promyty ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfáty (Phosphate-Buffered Saline, PBS) a fixovány po dobu 20 minut v 70% ethanolu vychlazeném na -20°C. Po fixaci byly vzorky znovu promyty v PBS a barveny fluorescenčními barvivami Hoechst 33342, který barví buněčná jádra (Sigma, USA, 5µg/ml PBS) a Texas Red C<sub>2</sub>-maleimid, který barví proteiny buněčné membrány a cytoplasmu (Molecular Probes, Invitrogen, 20ng/ml PBS) po dobu 1 hodiny ve tmě při pokojové teplotě. Poté byly vzorky opět promyty v PBS a buňky byly pozorovány a fotografovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus IX 51 s použitím digitální kamery Olympus DP 70.

### **7.1.4 Hodnocení adheze a růstu buněk**

Adheze a růst buněk byly hodnoceny počtem buněk 1., 3. a 7. den po nasazení. Vzorky byly opláchnuty PBS a materiály uvolněny z úchytů. Buňky byly od materiálu odděleny



roztokem trypsinu (0,5%) a kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA, 0,2%) v PBS. Proces uvolňování buněk od materiálu byl urychlen inkubací vzorků v termostatu (37 °C) po dobu 10 minut a následným třepáním po dobu 5 minut na třepačce. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce pod mikroskopem Olympus IX 71.

Analogicky k počtům buněk zjištěných v Bürkerově komůrce byla provedena kolorimetrická analýza buněčné proliferace a životaschopnosti pomocí XTT kitu (Cell Proliferation Kit II (XTT), Roche Diagnostic, GmbH, Germany, Cat. No 11 464 015 001). Principem tohoto testu je přeměna substrátu na barevný produkt, tj. tetrazoliové soli XTT na oranžově zbarvený formazan, mitochondriálními dehydrogenázami buněk. Výsledná absorbance kultivačního média (bez fenolové červeně) s formazanem byla měřena na přístroji ELISA READER (VERSAmax Microplate Reader, Molecular Devices) při vlnové délce 470 nm, doporučené výrobcem kitu, a referenční vlnové délce 660 nm.

### **7.1.5 Hodnocení diferenciac buněk**

Stupeň osteogenní diferenciac buněk byl měřen koncentrací markeru osteogenní diferenciac – osteokalcinu, tj. proteinu extracelulární matrix (ECM), který váže kalcium a tím se účastní mineralizace ECM v kostech. Celková koncentrace proteinů v buněčném homogenátu připraveném sonikací (přístroj UP 100 H, Dr. Hielscher GmbH) byla změřena kolorimetrickou Lowryho metodou. Následovala enzymatická imunosorbentní esej (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Aliquoty buněčných homogenátů odpovídající 1-50 µg proteinu v 50 µl vody byly adsorbovány na dno jamek mikrotitračních destiček o 96 jamkách (Maxisorp, Nunc) přes noc při 4°C. Po opláchnutí PBS byla nespecifická vazebná místa na dně jamek blokována 0.02% želatinou v PBS (100 µl/jamka, 60 min). Buněčný homogenát adsorbovaný na dně jamek byl dále inkubován s primární protilátkou proti osteokalcinu, tj. Rabbit-Anti-Osteocalcin (1-49)(human)IgG (Peninsula Laboratories Inc., ředěno 1:200, 50 µl/jamka, přes noc, 4°C), a po trojím opláchnutí v PBS se sekundární protilátkou Peroxidase-Conjugated-Goat-anti-Rabbit IgG (Sigma-Aldrich, kat. č. A9169, ředění 1:5000, 100 µl/jamka, 45 min při pokojové teplotě). Následně byl přidán roztok chromogenu s peroxidem vodíku (5 ml orthofenylendiamindihydrochlorid, 10 ml 0,1M fosfátového pufru Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O, 17 µl

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), který působil 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Absorbance vzorků byla změřena na přístroji ELISA READER (VERSAmax Microplate Reader, Molecular Devices) při vlnové délce 490 nm, doporučené metodickým návodem, a referenční vlnové délce 690 nm.

### **7.1.6 Statistická analýza**

Kvantitativní data byla prezentována jako průměr  $\pm$  střední chyba průměru (Standard Error of Mean, SEM). Statistická významnost byla posouzena použitím programu SigmaStat (Jandel Corporation, USA), kde bylo zvoleno hodnocení pomocí jednoparametrického testu ANOVA, provedeného Student-Newman-Keulsovou metodou. Počty buněk a absorbance získané u každého vzorku byly vůči hodnotám získaným u ostatních vzorků statisticky významné, pokud splňovaly hodnotu parametru  $p \leq 0,05$ .

## **7.2. Výsledky**

### **7.2.1 Adheze a růst buněk na materiálech**

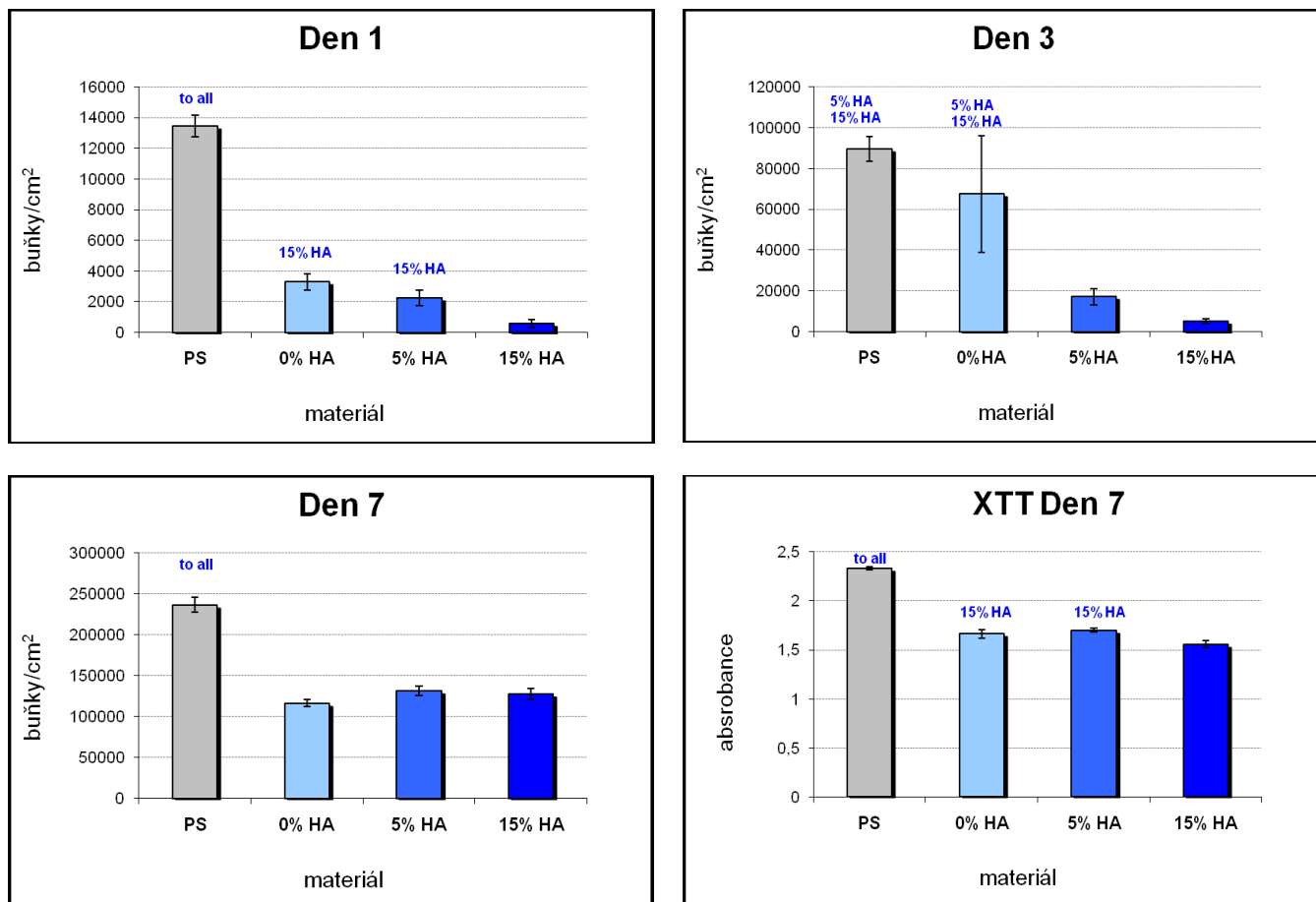
Počet lidských osteoblastů MG 63 na všech studovaných nanostrukturovaných materiálech byl první den po nasazení výrazně nižší než na polystyrenu. Nejnižší iniciální adheze byla v porovnání s ostatními vzorky pozorována na polylaktidu s 15 % HA (*Obr. 4*).

Třetí den po nasazení byl pozorován nejvyšší nárůst počtu buněk v porovnání s ostatními nanostrukturovanými materiály na polylaktidu bez příměsi hydroxyapatitu. Nejmenší nárůst počtu buněk byl opět zjištěn na polylaktidu s 15 % HA (*Obr. 4*).

Sedmý den po nasazení buněk se počty buněk na nanostrukturovaných materiálech vyrovnaly. Nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými materiály. Statisticky významně více buněk bylo pouze na kontrolním polystyrenu (*Obr. 4*).

XTT test, který hodnotí aktivitu mitochondriálních enzymů v buňkách, a tudíž je měřítkem počtu životaschopných buněk, ukázal sedmý den kultivace lehce snížený počet

živých buněk na materiálu s 15 % hydroxyapatitem. Mezi buňkami na materiálech s 0 % a 5 % HA nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl (Obr. 4).

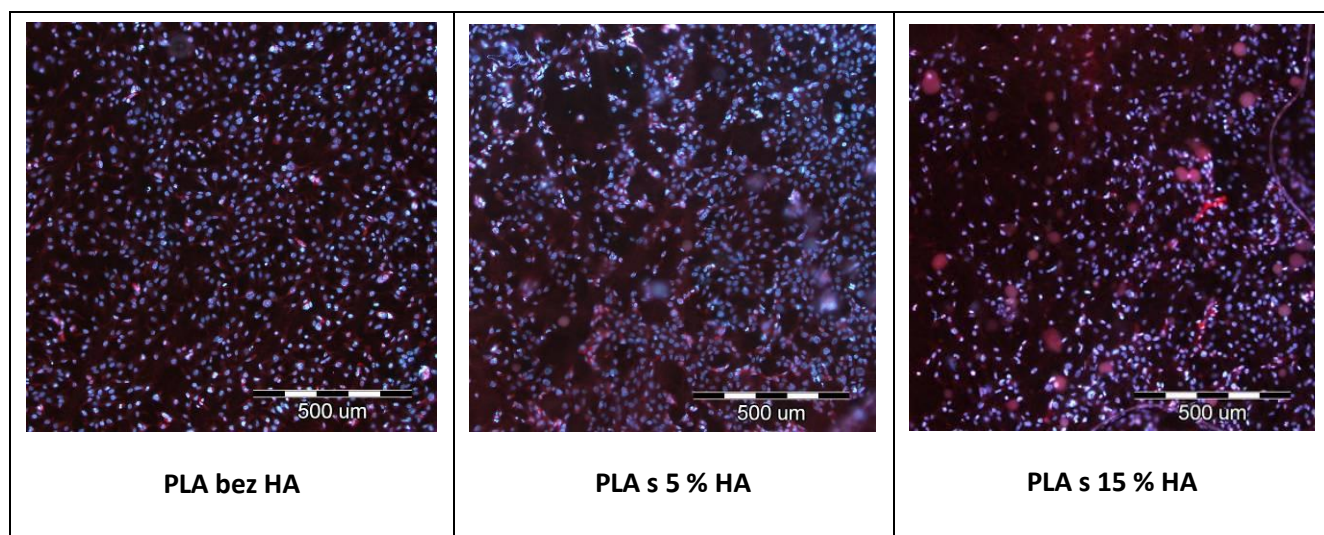


**Obr. 4:** Počet lidských osteoblastů MG 63 na cm<sup>2</sup> 1., 3. a 7 den po nasazení na poly(laktid) s 0 %, 5 % a 15 % hydroxyapatitu. Absorbance jednotlivých vzorků po provedeném XTT testu sedmý den po nasazení na poly(laktid) s 0 %, 5 % a 15 % hydroxyapatitu. Nad sloupci jsou vyznačeny vzorky, ve srovnání s nimiž je hodnota daného sloupce statisticky významná. Za statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky jsou považovány hodnoty  $p \leq 0,05$ .

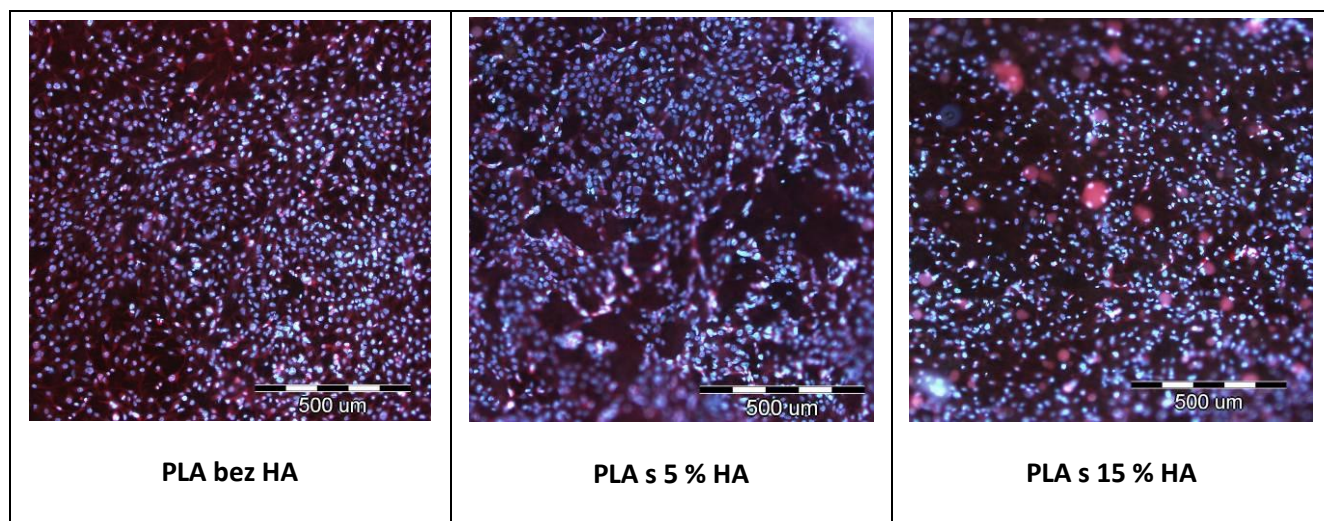
### 7.2.2 Morfologie buněk

Buňky vizualizované fluorescenčními barvivy Hoechst a Texas Red (viz Materiály a metody) měly modře obarvená buněčná jádra a červeně obarvené proteiny membrány a

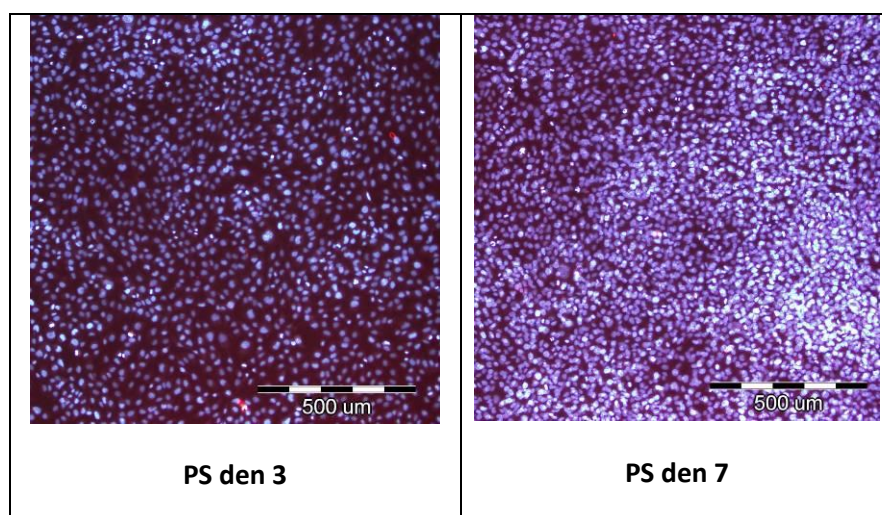
cytoplasmy. Tvary buněk ukazovaly na dobrou vitalitu buněk a jejich adhezi k materiálu, tj. buňky byly dobře rozprostřené, obvykle polygonální či vřetenovitě protáhlé ve směru vláken. Již třetí den po nasazení se vytvořila téměř souvislá (konfluentní) vrstva buněk, porůstající povrch nanovláknenné sítě. Některé buňky však pronikly i do nitra nanovláknenné sítě, tj. kolonizovaly celý „trojrozměrný prostor“ této sítě, rostly v různých rovinách, a tudíž nemohly být na obrázcích z konvenčního mikroskopu dobře zaostřeny (*Obr. 5*). Sedmý den po nasazení byly již nanovláknenné sítě hustě osídleny buňkami (*Obr. 6*). Populační hustoty buněk na kontrolním polystyrenu dosahují přesto mnohem vyšších hodnot (*Obr. 7*).



**Obr.5:** Buňky MG 63 na poly(laktidu) s odlišným množstvím nanokrystalického hydroxyapatitu třetí den po nasazení. Mikroskop Olympus IX71, digitální kamera DP70, obj. 10x.



**Obr. 6:** Buňky MG 63 na poly(laktidu) s odlišným množstvím nanokrystalického hydroxyapatitu sedmý den po nasazení. Mikroskop Olympus IX71, digitální kamera DP70, obj. 10x.

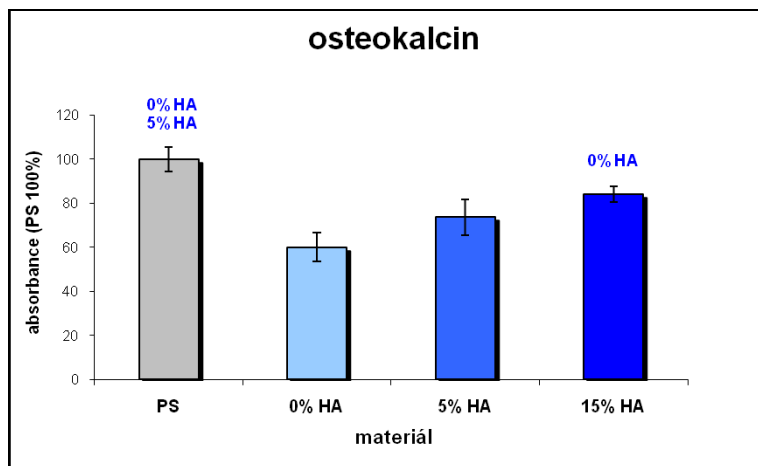


**Obr. 7** Buňky MG 63 na kontrolní polystyrenové misce třetí a sedmý den po nasazení. Mikroskop Olympus IX71, digitální kamera DP70, obj. 10x.

### 7.2.3 Osteogenní diferenciacce buněk

ELISA provedená na buňkách za 7 dní po nasazení ukázala, že koncentrace markeru osteogenní diferenciacce osteokalcinu, měřená na mg proteinu v buněčném homogenátu, je

významně vyšší v buňkách na materiálech s 15% obsahem nanokrystalického hydroxyapatitu než na ostatních nanostrukturovaných materiálech (Obr. 8).



**Obr.8** Koncentrace osteokalcinu u kostních buněk MG 63 na poly(laktidu) s 0 %, 5 % a 15 % hydroxyapatitu, stanovená metodou ELISA sedmý den po nasazení. Nad sloupce jsou vyznačeny vzorky, ve srovnání s nimiž je hodnota daného sloupce statisticky významná. Za statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky jsou považovány hodnoty  $p \leq 0,05$ . Absorbance je vyjádřena v % referenční hodnoty získané z buněk po kultivaci na standardních polystyrénových miskách.

### 7.3. Diskuse

Bylo zjištěno, že polylaktid ve formě nanovláknenných sítí umožnil adhezi a růst buněk na povrchu i uvnitř těchto nosičů. Morfologie buněk napovídala jejich dobrému uchycení a růstu na materiálu - buňky byly dobře rozprostřené a vrůstaly i do vnitřních pórů materiálu. Na kontrolním polystyrenu byly počty buněk vždy nejvyšší, což je zřejmě dáno rovným povrchem PS, na kterém se buňky bez problémů rozprostírají a proliferují. Naproti tomu na strukturovaném materiálu, tj. na polylaktidu ve formě sítě, mají buňky možnost uchytit se pouze na vláknech a při svém rozprostření musejí překovávat mezery mezi vlákny. V důsledku toho je na nanovláknenných sítích plocha kontaktu buňka-materiál menší, což pak může vést k pomalejšímu růstu buněk. Mezi nanostrukturovanými materiály byl nejvyšší počet iniciálně adherovaných buněk za 1 den po nasazení nalezen na polylaktidu bez příměsi nanokrystalického hydroxyapatitu. Třetí den po nasazení bylo nejvíce buněk opět na



materiálu bez hydroxyapatitu. V této souvislosti nelze zcela vyloučit nepříznivý vliv hydroxyapatitu na růst buněk – mohlo například docházet k jeho rychlé degradaci a uvolňování kalciových iontů v relativně vysokých koncentracích. Na druhé straně se však sedmý den počty buněk na všech třech testovaných materiálech vyrovnaly, což ukazuje na relativně dobrou růstovou schopnost a životaschopnost buněk na materiálech s HA. Pouze XTT test ukázal na mírný pokles metabolické aktivity buněk na materiálu s 15 % HA sedmý den po nasazení ve srovnání s buňkami na ostatních materiálech. Koncentrace osteokalcinu, proteinu osteogenní diferenciace, však byla významně vyšší na materiálech s 5 % a 15 % příměsí HA. Tento výsledek naznačuje, že nižší počet buněk na materiálu s 15 % HA, tj. snížení proliferační aktivity buněk, bylo provázeno zvýšenou osteogenní diferenciací buněk na materiálech obohacených HA. Podobného výsledku bylo dosaženo i na materiálech se zvýšenou drsností v řádu mikrometrů, která omezovala proliferaci buněk ve prospěch jejich diferenciace (Schneider *et al.*, 2003; Lossdorfer *et al.*, 2004).

Můžeme se tedy domnívat, že polylaktid sám o sobě je velmi vhodným materiálem pro adhezi a proliferaci buněk. Obohacení toho polymeru o částice hydroxyapatitu v jednotkách nanometrů navíc zvýšilo i potřebnou diferenciaci buněk do žádaného fenotypu, v tomto případě fenotypu osteogenního. Nanokrystalické částice HA v polymerním materiálu napodobují přirozené anorganické komponenty extracelulární matrix kostní tkáně.

Další studie ukázaly, že příměs hydroxyapatitu nejen zvyšuje diferenciaci buněk, ale zároveň zlepšuje mechanické vlastnosti polymerního materiálu. Kompozity složené z polylaktidu a hydroxyapatitu v rozměrech nanometrů tak kombinují mechanickou pevnost materiálu a zároveň napodobují přirozenou strukturu extracelulární matrix v kostní tkáni (Jeong *et al.*, 2008).

Existují také práce zabývající se nejen kombinacemi různých materiálů s hydroxyapatitem a následným zlepšením vlastností výchozího materiálu, ale zaměřují se přímo na vlastnosti hydroxyapatitu samotného. Ukázalo se, že tvar krystalků hydroxyapatitu má zásadní vliv na chování buněk (Chou *et al.*, 2005), a rovněž velikost částic je kritická. Krystalky v řádech mikrometrů se ukázaly dokonce jako nepříznivé a snižující proliferaci buněk na materiálu (Bačáková *et al.*, 2001a).

## **8. Závěr a další perspektivy**

Fyzikální a chemické vlastnosti materiálu, jako je jeho chemické složení, smáčivost či povrchová morfologie, hrají klíčovou roli v regulaci adheze, růstu, životaschopnosti, diferenciaci a funkce buněk. Buňky totiž obvykle adherují k umělému materiálu prostřednictvím adsorbovaných proteinů, jejichž typ, množství a geometrická konformace je ovlivněna právě uvedenými vlastnostmi materiálů. Důležitou úlohu v interakci buňka-materiál hraje drsnost materiálu. Drsnost v řádu mikrometrů může omezovat adhesi, rozprostření a následnou proliferaci buněk, ale podporovat jejich osteogenní diferenciaci. Nanodrsnost naproti tomu hraje jednoznačně pozitivní roli ve všech aspektech chování a funkce buněk.

Materiály vhodné jako náhrady kostní tkáně by měly umožnit dobrou iniciální adhezi osteoblastů ke svému povrchu a následně jejich poměrně rychlou proliferaci tak, aby byl implantát souvisle pokryt osteoblasty. Tak by mělo dojít k integraci náhrady do okolní tkáně. V procesu této integrace je dále zásadní, aby byly buňky diferencovány do správného buněčného typu; v tomto případě je nutné, aby proběhla tzv. osteogenní diferenciaci.

V této práci byl testován polymerní materiál polylaktid ve formě nanovláknenných sítí, připravených metodou elektrostatického zvlákňování. K dispozici jsme měli čistý materiál bez příměsí, a poté polylaktid s příměsí nanokrystalického hydroxyapatitu v množství 5 % a 15 %. Všechny materiály umožnily dobrou adhezi a růst buněk. Nebyla prokázána jasná cytotoxicita materiálu nebo úplná inhibice proliferace buněk. Morfologie buněk napovídala jejich dobrému uchycení a růstu na materiálu a XTT test viability buněk sedmý den po nasazení potvrdil vysokou životaschopnost buněk. Marker osteogenní diferenciaci, protein osteokalcin, byl nejvíce syntetizován v buňkách na materiálech s 5 % a 15 % příměsí hydroxyapatitu. Současně byla XTT testem na polylaktidu s 15 % hydroxyapatitem prokázána mírně nižší metabolická aktivita buněk, která obvykle odpovídá nižšímu počtu buněk. Snížená proliferační aktivita buněk pak může navodit zvýšenou diferenciaci buněk do žádaného buněčného typu.

Domníváme se, že materiály testované v této práci mají velký potenciál pro budoucí využití v tkáňovém inženýrství kostní tkáně. Příměs nanokrystalického hydroxyapatitu může



vylepšit mechanické vlastnosti příliš měkkých a elastických polymerů pro inženýrství kostní tkáně, a zároveň stimuluje osteogenní diferenciaci buněk.

## **9. Použitá literatura**

Akay G, Birch MA & Bokhari MA (2004). Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro. *Biomaterials* **25**, 3991-4000.

Albelda SM & Buck CA (1990). Integrins and other cell-adhesion molecules. *Faseb Journal* **4**, 2868-2880.

Bačáková L, Filová E, Rypáček F, Švorčík V & Starý V (2004). Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiological Research* **53**, 35-45.

Bačáková L, Mareš V, Lisá V & Švorčík V (2000). Molecular mechanisms of improved adhesion and growth of an endothelial cell line cultured on polystyrene implanted with fluorine ions. *Biomaterials* **21**, 1173-1179.

Bačáková L, Starý V, Kofroňová O & Lisá V (2001a). Polishing and coating carbon fiber-reinforced carbon composites with a carbon-titanium layer enhances adhesion and growth of osteoblast-like MG63 cells and vascular smooth muscle cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research* **54**, 567-578.

Bačáková L, Walachová K, Švorčík V & Hnatowicz V (2001b). Adhesion and proliferation of rat vascular smooth muscle cells (VSMC) on polyethylene implanted with O<sup>+</sup> and C<sup>+</sup> ions. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **12**, 817-834.

Banerjee P, Irvine DJ, Mayes AM & Griffith LG (2000). Polymer latexes for cell-resistant and cell-interactive surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* **50**, 331-339.

Clover J, Dodds RA & Gowen M (1992). Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclasts insitu and in culture. *Journal of Cell Science* **103**, 267-276.

- Cook AD, Hrkach JS, Gao NN, Johnson IM, Pajvani UB, Cannizzaro SM & Langer R (1997). Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *Journal of Biomedical Materials Research* **35**, 513-523.
- Dee KC, Andersen TT & Bizios R (1998). Design and function of novel osteoblast-adhesive peptides for chemical modification of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research* **40**, 371-377.
- Garcia AJ (2005). Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* **26**, 7525-7529.
- Garcia AJ, Vega MD & Boettiger D (1999). Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 785-798.
- Griffith LG (2000). Polymeric biomaterials. *Acta materialia* **48**, 263-277
- Groth T, Altankov G, Kostadinova A, Krasteva N, Albrecht W & Paul D (1999). Altered vitronectin receptor (alpha(v) integrin) function in fibroblasts adhering on hydrophobic glass. *Journal of Biomedical Materials Research* **44**, 341-351.
- Han YK, Kwon JW, Kim JS, Cho CS, Wee WR & Lee JH (2003). In vitro and in vivo study of lens refilling with poloxamer hydrogel. *British Journal of Ophthalmology* **87**, 1399-1402.
- Hemler ME (1998). Integrin associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **10**, 578-585.
- Hench LL & Polak JM (2002). Third-generation biomedical materials. *Science* **295**, 1014-1017
- Horbett TA (2004): The role of adsorbed proteins in tissue response to biomaterials. V: Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Eds. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 237-246.
- Horton MA (1997). The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **29**, 721-725.

- Huang S, Chen CS & Ingber DE (1998). Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 3179-3193.
- Humphries JD, Askari JA, Zhang XP, Takada Y, Humphries MJ & Mould AP (2000). Molecular basis of ligand recognition by integrin alpha(5)beta(1) - II. Specificity of Arg-Gly-Asp binding is determined by Trp(157) of the alpha subunit. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 20337-20345.
- Hynes RO (1999). Cell adhesion: old and new questions. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 33-37.
- Chou YF, Huang WB, Dunn JCY, Miller TA & Wu BM (2005). The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression. *Biomaterials* **26**, 285-295.
- Irvine DJ, Mayes AM & Griffith LG (2001). Nanoscale clustering of RGD peptides at surfaces using comb polymers. 1. Synthesis and characterization of comb thin films. *Biomacromolecules* **2**, 85-94.
- Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ & Mikos AG (1998). Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials* **19**, 1405-1412.
- Jeong SI, Ko EK, Yum J, Jung CH, Lee YM & Shin H (2008). Nanofibrous Poly(lactic acid)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Guided Tissue Regeneration. *Macromolecular Bioscience* **8**, 328-338.
- Keselowsky BG, Collard DM & Garcia AJ (2003). Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **66A**, 247-259.
- Kim JH & Kim SC (2002). PEO-grafting on PU/PS IPNs for enhanced blood compatibility - effect of pendant length and grafting density. *Biomaterials* **23**, 2015-2025.
- Kim SS, Park MS, Jeon O, Choi CY & Kim BS (2006). Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 1399-1409.

- Kose GT, Ber S, Korkusuz F & Hasirci V (2003). Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) based tissue engineering matrices. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **14**, 121-126.
- Kubies D, Rypáček F, Kovářová J & Lednický F (2000). Microdomain structure in polylactide-block-poly(ethylene oxide) copolymer films. *Biomaterials* **21**, 529-536.
- Langer R & Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science* **260**, 920-926.
- Lossdorfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, Cochran DL & Boyan BD (2004). Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **70A**, 361-369.
- Pamula E, Bačáková L, Filová E, Buczynská J, Dobrzynski P, Nosková L & Grausová L (2008). The influence of pore size on colonization of poly(L-lactide-glycolide) scaffolds with human osteoblast-like MG 63 cells in vitro. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **19**, 425-435.
- Park J & Bronzino J (2003). *Biomaterials: Principles and applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, IV.
- Park YD, Tirelli N, Hubbell JA (2003). Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating network. *Biomaterials* **24**, 893-900.
- Ren L, Tsuru K, Hayakawa S & Osaka A (2002). Novel approach to fabricate porous gelatin-siloxane hybrids for bone tissue engineering. *Biomaterials* **23**, 4765-4773.
- Rypáček F, Machová L, Kotva R & Škarda V (2001). Polyesters with functional-peptide blocks: Synthesis and application to biomaterials. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **221**, 452-PMSE.

- Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J & Stanford C (2003). Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *Journal of Dental Research* **82**, 372-376.
- Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF & Jansen JA (2005). Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials* **26**, 137-146.
- Smetana K & Vacík J (1997). Anionic polymers for implantation. V: *Bioartificial Organs - Science, Medicine, and Technology*, vol. 831. Eds. Prokop A, Hunkeler D & Cherrington Ad, New York Acad Sciences, New York, 95-100.
- Smetana K, Šulc J, Krčová Z & Pitrová S (1987). Intraocular biocompatibility of hydroxyethyl methacrylate and methacrylic-acid copolymer partially hydrolyzed poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *Journal of Biomedical Materials Research* **21**, 1247-1253.
- Starý V, Bačáková L, Horník J & Chmelík V (2003). Bio-compatibility of the surface layer of pyrolytic graphite. *Thin Solid Films* **433**, 191-198.
- Vagaská B, Bačáková L, Pamula E, Lisá V, Dobrzynski P (2006). Adhesion and growth of human osteoblast-like cells on apliphatic polyesters with different chemical composition, surface roughness and modification with hydroxyapatite. *Inzynieria Biomaterialów (Engineering of Biomaterials)* **9**, 58-60.
- VandeVondele S, Voros J & Hubbell JA (2003). RGD-Grafted poly-l-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion. *Biotechnology and Bioengineering* **82**, 784-790.
- Wang HN, Li YB, Zuo Y, Li JH, Ma SS, Cheng L (2007). Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **28**, 3338-3348
- Wang M (2003). Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials* **24**, 2133-2151.

- Wang DA, Ji J, Sun YH, Shen JC, Feng LX & Elisseeff JH (2002a). In situ immobilization of proteins and RGD peptide on polyurethane surfaces via poly(ethylene oxide) coupling polymers for human endothelial cell growth. *Biomacromolecules* **3**, 1286-1295.
- Wang X, Li Y, Wei J & de Groot K (2002b). Development of biomimetic nano-hydroxyapatite/poly(hexa- methyleneadipamide) composites. *Biomaterials* **23**, 4787-4791.
- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW & Bizios R (2000). Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research* **51**, 475-483.
- Whittaker CA & Hynes RO (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin a domains: Widely dispersed adhesion and elsewhere. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 3369-3387.
- Woo KM, Chen VJ & Ma PX (2003). Nano-fibrous scaffolding architecture enhances protein adsorption and cell attachment. V: *Bioinspired Nanoscale Hybrid Systems*, vol. 735. Eds. Simon U, Schmid G, Hong S, Stranick Sj & Arrivo Sm. Materials Research Society, Warrendale. 69-73.
- Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL & Polak JM (2001). Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass (R) 45S5 dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research* **55**, 151-157.
- Yamamoto M, Tabata Y, Kawasaki H & Ikada Y (2000). Promotion of fibrovascular tissue ingrowth into porous sponges by basic fibroblast growth factor. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **11**, 213-218.